云南、广西树鼩乳酸脱氢酶(LDH)同功酶的比较研究

季维智 邹如金 汤上川

(中国科学院昆明动物研究所
中国实验动物云南灵长类中心 灵长类学联合实验室)

摘 要

本文利用同功酶丙烯酰胺圆盘电泳技术，研究了云南昆明、广西南宁和瑶山树鼩的乳酸脱氢酶(LDH)同功酶和种群关系。对三种树鼩的六种组织(心、肝、肺、脾、肾和肌肉)的LDH作了比较分析，其酶谱表现了组织的异质性，但无性别的差异。不同产地的树鼩的LDH同功酶酶谱也出现一定的差异，与有关形态分类的研究结果一致。昆明、南宁和瑶山树鼩似应为三个亚种。

关键词：树鼩，乳酸脱氢酶，同功酶

树鼩是一类攀缘型的小型哺乳动物。长期以来由于系统分类地位的争议而引人注目，近年来有人提出树鼩既不是食虫目(Insectivora)也不是灵长目(Primates)，而是一独立的树鼩目(Scandentia)(Corbet and Hill, 1980; Honcki *et al.*, 1982)。

我国的树鼩主要分布于云南、贵州、四川、广西和海南岛等省，为一个种 *Tupaia belangeri*(王应祥，1987；Allen, 1983；Denc *et al.*, 1938)。有关它的亚种分化则存在不同意见。Allen(1938)把我国的树鼩整理为三个亚种；Ellerman Morrison-Scott(1951)根据Osgood(1932)的观点主张为两个亚种；王应祥(1987)则认为有六个亚种，其中分布于云南昆明、广西南宁和瑶山的树鼩为三个亚种，滇南亚种(*Tupaia belangeri yunalis*)、越北亚种(*T. b. tonquinia*)和瑶山亚种(*T. b. yaoshanensis*)。

利用同功酶来研究细胞分化过程中的基因作用机理以及生物群体的遗传进化规律，已引起了人们的广泛兴趣。自Hunter和Markert(1957)以来，发现LDH同功酶大量存在于不同的组织器官，其四聚体的数目和活性有很大差异，是基因的生化表现型(Shaw and Prasad, 1970; Wilson *et al.*, 1973)。因此同功酶可以作为各组织器官特异性的重要标志。利用同功酶在各物种，种群上的特异表达进行生物分类的研究，也是对传统

本文1989年7月17日收到，同年10月28日修回。

分类学的重要补充。本文对昆明、南宁和瑶山树鼩的LDH同功酶进行了分析比较，其目的在于了解这三种树鼩组织的同功酶谱以及它们之间的异同，为讨论它们的分类地位以及各器官组织中的特异性提供依据。

材料和方法

1.组织匀浆的制备，13只采自昆明、南宁和瑶山的树鼩(活体)，其中雌性8只，雄性5只，体重120—170g（表1）；在冰上解剖，摘取心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肺和肌肉（取自树鼩大腿）六种新鲜组织各0.5—0.8g，分别置于冷磷酸缓冲液（4°C 0.1*M* pH7.0）或生理盐水中洗去粘附血液并剪碎，放入玻璃匀浆器中在冰浴中进行匀浆。缓冲液的比例为1:5（重量／体积）。匀浆液4°C，45,000g离心30分钟，取上清液，每40μl分装于一只安瓿中，－25°C储藏待用。

2.电泳，采用聚丙烯酰胺圆盘凝胶电泳（PAGE）法。根据Davis（1964）方法制备6.6%分离胶和2.5%浓缩胶（见表2）。酶加样量为30微升。电报缓冲系统为pH8.3 Tris-甘氨酸缓冲液。采用DY-74Ⅱ型恒流稳压电泳仪。电压240V，电流3mA/管，在4°C冰箱内电泳约120分钟，直至溴酚兰示踪剂泳动至距原点5厘米处。

表1 研究材料

树鼩号	性别	体重(克)	体色	产地
1～3	♀	120～141	体背	云南昆明
4，5	♂	123，147	褐色	云南昆明
6～8	♀	144～174	体背	广西南宁
9，10	♂	167，172	褐黄	广西南宁
11，12	♀	131，144	体背	广西瑶山
13	♂		褐红	广西瑶山

表2 胶的配制

贮液	100毫升溶液中含量		pH	溶液混合比
A	1当量盐酸	48ml	8.8	分离胶
	Tris	36.3g		A:B:C:水＝
	TEMED	0.23ml		1:2.4:3.9:3.8
B	丙烯酰胺	30g		凝胶浓度6.6%
	甲叉丙烯酰胺	0.8g		
C	过硫酸胺	0.14g		
D	1当量盐酸	48ml	6.7	浓缩胶
	Tris	6g		D:E:F:C＝
	TEMED	0.46ml		1:2:1:4
E	丙烯酰胺	10g		凝胶浓度2.5%
	甲叉丙烯酰胺	2.5g		
F	蔗糖	40g		

3.染色，参照Markert和Massaro（1966）方法。

4.电泳扫描，使用岛津VU—910光密度扫描仪，波长λS 630nm，记录纸速度为同步扫描。

5.迁移率 相对迁移率（Rf）的计量为

$$Rf = \frac{原点到色带前沿的距离}{原点到溴酚蓝色带的距离}$$

结　果

云南昆明、广西南宁和瑶山的13只树鼩的心脏、肝脏、肺、脾脏、肾脏和肌肉等6种组织的LDH同功酶的电泳均显带，谱带显色清楚，迁移率稳定，重复性强，表现了组织的特异性，但无性别差异（图1—3）。不同产地的树鼩各组织的LDH同功酶谱也表现了一定的差异（图4）。电泳扫描的结果与酶谱一致。

昆明树鼩肝脏、脾脏、肾脏和肌肉的LDH同功酶都显示出5条带，心脏4条带，肺仅3条带(图1)。南宁树鼩的肝脏、肺脏、脾脏和肌肉的LDH同功酶有5条带，心脏和肾脏只有4条带（图2）。瑶山树鼩各组织的LDH同功酶谱带变化较大，肺和肌肉为5条带，心脏和肝脏只有4条带，脾脏为6条带，肾脏则为7条带（图3）。三种树鼩相同组织间的比较如图4 Ⅰ—Ⅵ和表3。

1.心脏　三种树鼩心脏的LDH同功酶谱带都是4条，其迁移率和谱带着色深浅都十分相似（图4 Ⅰ；表3）。

2.肝脏　昆明树鼩和南宁树鼩肝脏的LDH同功酶谱为5条带，瑶山树鼩仅4条，它们的迁移率和着色深浅都不同（图4 Ⅱ；表3）。

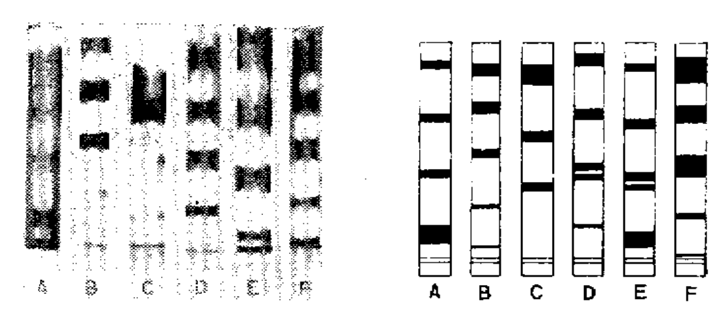


图1　云南昆明树鼩（滇南亚种 *T. b. yunalis*）六种组织LDH同功酶图谱
A：心脏，B：肝脏，C：肺，D：脾脏，E：肾脏，F：肌肉。
电泳图谱仅表现了不同组织器官的差异，而无性别差异

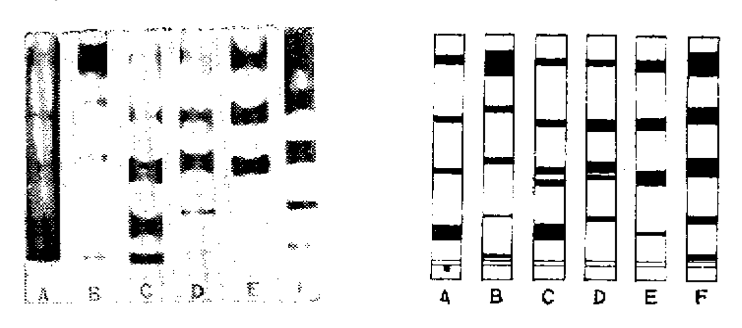


图2　广西南宁树鼩（越北亚种 *T. b. toquinia*）六种组织LDH同功酶图谱
A：心脏，B：肝脏，C：肺，D：脾脏，E：肾脏，F：肌肉。
电泳图谱仅表现了不同组织器官的差异，而无性别差异

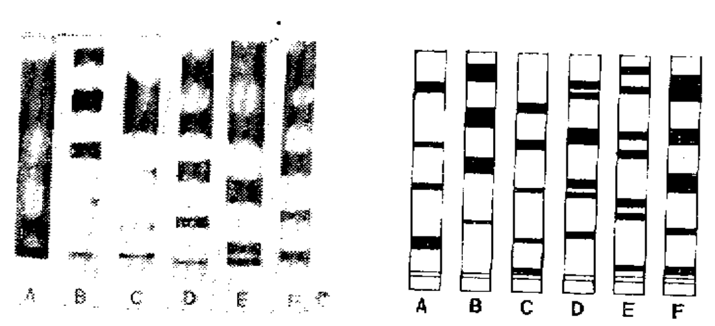


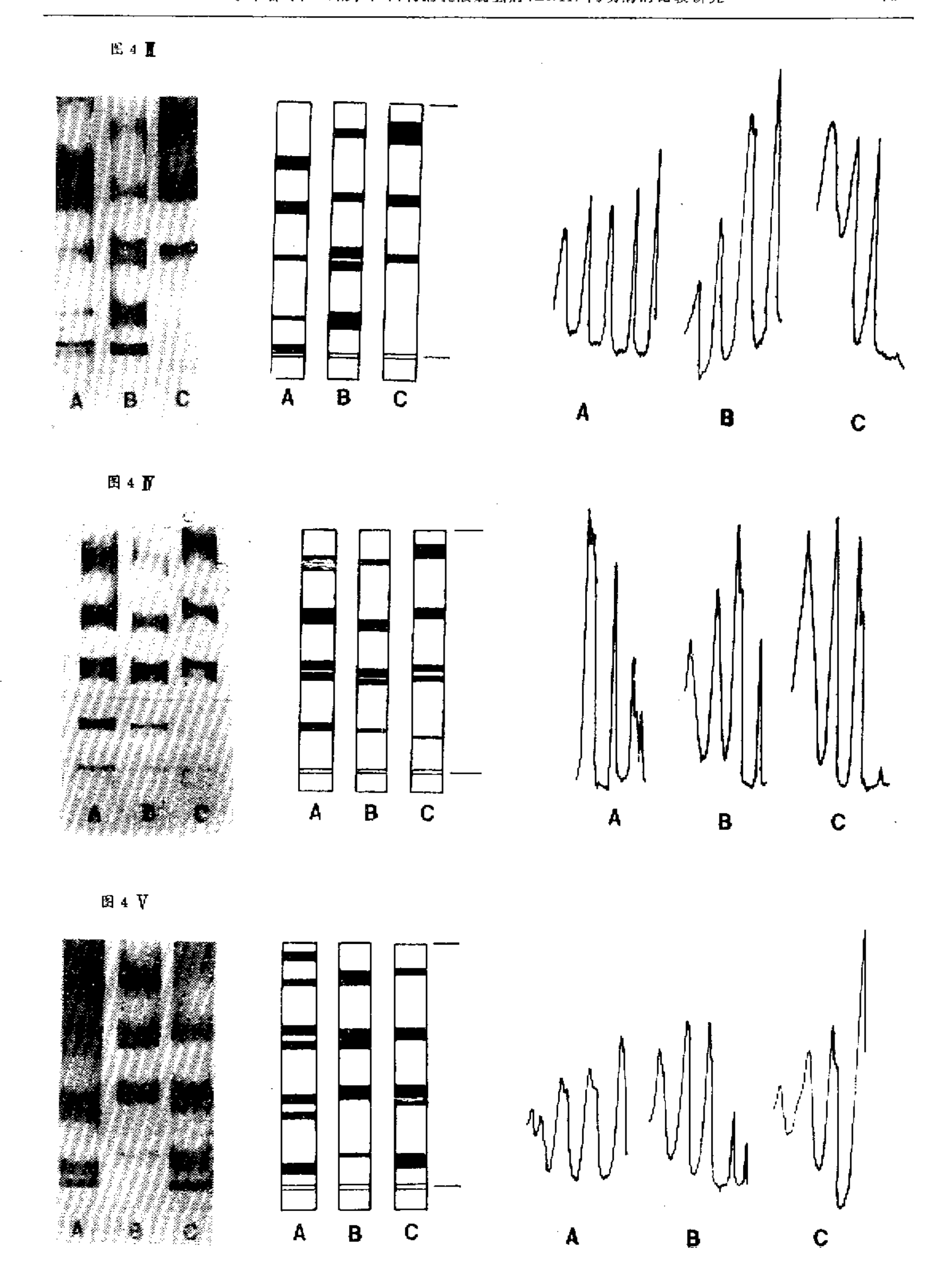
图3 广西瑶山树鼩（瑶山亚种*T. b. yaoshanensis*）六种组织LDH同功酶图谱
A：心脏，B：肝脏，C：肺，D：脾脏，E：肾脏，F：肌肉。
电泳图谱仅表现了不同组织器官的差异，无性别差异。

图4 Ⅰ

原 点
指示线
A B C
A B C

图4 Ⅱ

A B C
A B C
A B C


图4 Ⅲ
A B C
A B C
A B C
图4 Ⅳ
A B C
A B C
A B C
图4 Ⅴ
A B C
A B C
A B C

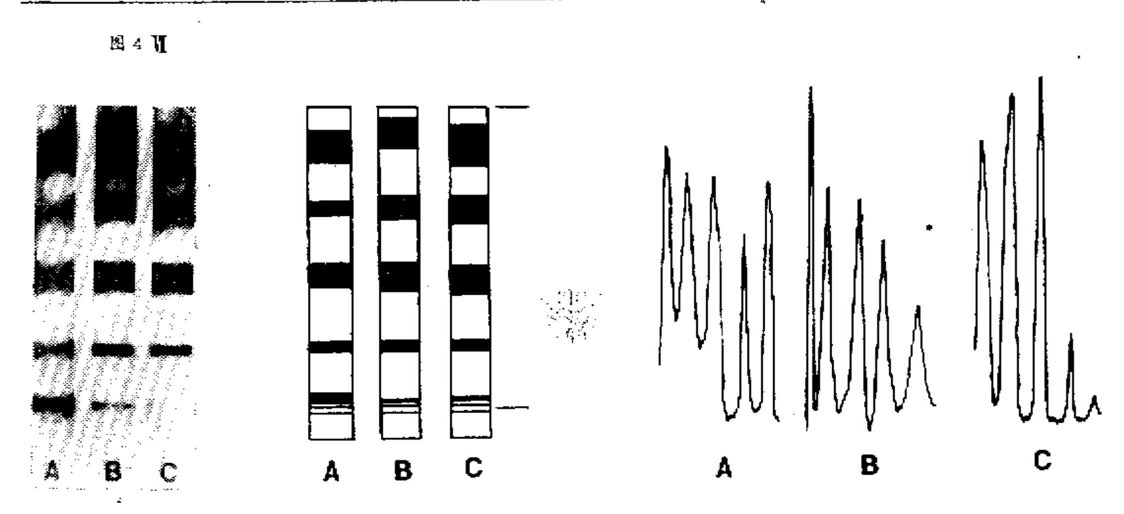


图4 三种树鼩六种组织LDH同功酶谱的比较

Ⅰ：心脏图谱，Ⅱ：肝脏图谱，Ⅲ：肺图谱，Ⅳ：脾脏图谱，Ⅴ：肾脏图谱，Ⅵ：肌肉图谱。

A：瑶山亚种*T. b. yaoshanensis*，B：越北亚种*T. b. tonquinia*，C：滇南亚种*T. b. yunalis*.

3.肺 南宁和瑶山树鼩肺的 LDH 同功酶谱带为 5 条，但它们的迁移率和谱带着色深浅十分不同；云南树鼩的肺的 LDH 同功酶谱带仅 3 条（图 4 Ⅲ；表 3）。

4.脾脏 昆明和南宁树鼩的脾脏的 LDH 同功酶谱均表现 5 条带其迁移率相似；而瑶山树鼩脾脏的 LDH 同功酶的谱带有 6 条，与上述两种树鼩比较，其迁移率，谱带着色深浅不尽相同（图 4 Ⅳ；表 3）。

5.肾脏 三种树鼩肾脏的LDH 同功酶表现出的酶谱完全不同，昆明树鼩的 LDH同功酶谱带是 5 条，南宁的是 4 条，而瑶山的达 7 条之多。其迁移率和谱带着色深浅也不相同（图 4 Ⅴ；表 3）。

6.肌肉 三种树鼩肌肉的 LDH 同功酶的谱带都是 5 条，迁移率，谱带着色深浅等表现的特征十分相似（图 4 Ⅵ；表 3）。

讨 论

同功酶与决定生物性状遗传的基因有密切关系。LDH 同功酶是了解得最清楚的一种调节NAD（烟酰胺腺嘌呤双核苷酸）与NADH（NAD的还原型）的比例的一种糖代谢的关键酶，也是比较生物化学研究和研究基因遗传进化的理想蛋白质。它是由二类亚基（α、β亚基）排列组合而成的四聚体杂交分子，组成五种同功酶，电泳图谱表现为 5 条带。鉴于 LDH 的分子构型受基因所控制，而且在各种生物体内表现出明显的种类特异性和组织器官特异性，所以已被广泛用来作为鉴别生物种类别的遗传标志之一（Markert and Moller, 1959; Kaplan *et al.*, 1960）。

我们的实验结果表明，云南昆明，广西南宁及瑶山的树鼩的 6 种组织器官的LDH同功酶除心脏和肌肉外（图 4 、Ⅰ、Ⅵ），肝脏、肾脏、脾脏和肺无论在酶谱或各区带显

表3　三种树鼩LDH同功酶比较

树鼩	心 谱带数	心 Rf	肝 谱带数	肝 Rf	肺 谱带数	肺 Rf	脾 谱带数	脾 Rf	肾 谱带数	肾 Rf	肌肉 谱带数	肌肉 Rf
滇南亚种		L_1:0.067		L_1:0.094		L_1:0.074		L_1:0.060		L_1:0.102		L_1:0.065
		L_2:0.348		L_2:0.287		L_2:0.287		L_2:0.330		L_2:0.357		L_2:0.198
	4	L_3:0.587	5	L_3:0.514	3	L_3:0.608	5	L_3:0.561	5	L_3:0.592	5	L_3:0.537
(采自昆明)		L_4:0.872		L_4:0.737				L_4:0.616		L_4:0.650		L_4:0.780
				L_5:0.953				L_5:0.863		L_5:0.882		L_5:0.974
越北亚种		L_1:0.063		L_1:0.031		L_1:0.108		L_1:0.122		L_1:0.111		L_1:0.043
		L_2:0.355		L_2:0.278		L_2:0.367		L_2:0.379		L_2:0.368		L_2:0.302
	4	L_3:0.582	5	L_3:0.523	5	L_3:0.584	5	L_3:0.583	4	L_3:0.596	5	L_3:0.524
(采自南宁)		L_4:0.852		L_4:0.782		L_4:0.639		L_4:0.625		L_4:0.882		L_4:0.761
				L_5:0.976		L_5:0.840		L_5:0.836				L_5:0.980
瑶山亚种		L_1:0.117		L_1:0.047		L_1:0.228		L_1:0.111		L_1:0.040		L_1:0.083
		L_2:0.160		L_2:0.245		L_2:0.407		L_2:0.153		L_2:0.157		L_2:0.326
		L_3:0.584		L_3:0.488		L_3:0.618		L_3:0.333		L_3:0.355		L_3:0.524
	4	L_4:0.852	4	L_4:0.737	5	L_4:0.861	6	L_4:0.552	7	L_4:0.419	5	L_4:0.785
(采自瑶山)						L_5:0.975		L_5:0.601		L_5:0.634		L_5:0.959
								L_6:0.812		L_6:0.712		
										L_7:0.929		

示的酶活力都存在较大的差异（图4，Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ；表3）。似与王应祥（1987）的形态分类结果一致。说明 LDH 同功酶电泳在树鼩的系统分类上有一定的参考价值。上述三种树鼩属于三个不同亚种，即滇南亚种（*Tupaia belangeri yunalis*），越北亚种（*T. b. toquinia*）和瑶山亚种（*T. b. yaoshanensis*）。这三个亚种中较为特殊的是瑶山亚种的肾脏和脾脏的 LDH 同功酶谱显示出7条和6条带，超过单一由A基因和B基因控制的α、β两种亚基可能形成的四聚体种数（B_4、A_1B_3、A_2B_2、A_3B_1、A_4）。这可能是重复基因在肾和脾中表达，表现祖征。由此可推测瑶山亚种与越北亚种相距较远，而后两者相距较近。

这三个亚种的 LDH 同功酶谱（图1—3）在3至7条之间，扫描结果与之一致。这种情况称为酶谱多样性，这在其他动物的研究中也有报道（罗莉中等，1982；杨玉华，1983；熊全沫等，1985；Shaw and Prasad, 1970；Wilson *et al.*, 1973；Yamamura, 1979）。关于这种LDH同功酶多样性存在两种解释：（1）遗传的，包括多基因位点和一个位点上的复等位基因（即群体杂合子）。Markert（1975a, b）提出，在活细胞中，有不同的原理能产生任何一种酶的多分子形式。例如在基因的复制过程中，每一个拷贝都可能由于突变而产生差异，从而产生与原来酶分子有所不同的酶分子。LDH 同功酶的亚单位至少有三种结构为其编码。（2）后生形式，即转译后的蛋白质修饰（Markert, 1975a, b；Harris, 1975；Yamamura *et al.*, 1979）。这种解释认为，在正常的亚单位转译后，由于二硫键桥，氢键及多肽键间各种形式的相互作用，可以改变酶的三维空间结构，达到后生形式的修饰。从而造成同功酶谱的多样性。

有关我国树鼩 LDH 同功酶的研究尚未见报道，故无法进行比较。

参 考 文 献

王应祥 1987 中国树鼩分类研究。动物学研究 8（3）：213—228。

罗莉中等 1982 金鱼乳酸脱氢酶的同功酶的发生遗传学研究 Ⅰ鲫鱼和红龙睛金鱼各组织器官乳酸脱氢酶的同功酶的比较。遗传学报 9（5）：375—380。

杨玉华 1983 我国大蟾蜍（*Bufo bufo*）三个亚种的C带 Ag-NOR及血清蛋白、乳酸脱氢酶（LDH）同功酶电泳的比较研究。两栖爬行动物学报 2（1）：1—9。

熊全沫 夏盛林 1985 中国胭脂鱼同功酶的研究。动物学报 31（1）：20—27。

Harris, H. 1981（沈若谦等译）人类生化遗传学原理。科学出版社 19—56。

Allen, G. M. 1938 Mammals of China and Mongolia. Part. I, New York: Amer. Mus. (Nat. Hist.)

Davis, B. J. 1964 Disc electrophoresis-11 method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121: 404.

Ellerman, J. R. and Morrison-Scott, T. C. S. 1951 Checklist of Palaearctic and Indian Mammals. Brit. Mus. (Nat. Hist.)

Hunter, R. L. and Markert, C. L. 1957 *Scince*, 125:3261:1294—1295

Kaplan, N. O. *et al.* 1960 Molecular heterogeneity evolution of enzymes. *Science*. 131:392—397.

Markert, C. L. *et al.* 1975a Evolution of a gene: Multiple gene for LDH isozymmes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science*, 189; 102—114.

Markert, C. L. 1975b Isozymes. Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ. Academic press, New York, San Francisco, London.

Markert, C. L. and Massaro, E. J. 1966 In vitro hybrization of lactate dehydrogenease in the proesence of arsenate and nitrationa.

Markert, C. L. and Moller, F. 1955 Multiple forms of enzymes: Tissue ontogenetic and species-specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 45:753—763.

Osgood, W. H. 1932 Mammals of the Kelleye-Roosevelts and Delacoyr Asiatic expeditions. *Field Mus. Nat. Hist. Publ. Zool. Ser.*, 18:193—339.

Shaw, R. C. and Prasad, R. 1969 Starch gel electrophoresis of enzymes a compolation of recipes. *Biochem. Genitics*, 4:297—320.

Wilson, F. R. *et al.* 1973 *Comp. Biochem. Physiol.* 46B: 105—116.

Yamamura, K. I. *et al.* 1979 *J. Exp. Zoll.* 208:271—280.

A COMPARATIVE STUDY OF LACTATE DEHYDROGENASE (LDH) ISOZYMES IN YUNNAN AND GUANGXI TREE SHREWS

Ji Weizhi* Zou Rujin Yang Shangchuan

(Joint Laboratory of Primatology, KIZ & YNLPC)

*Kunming Institute of Zoology

Academia Sinica

Kunming, Yunnan

The People's Republic of China

Using the method of electrophresis, the lactate dehydrogenase (LDH) and population relationship of Yunnan and Guangxi tree shrews is studied by isozyme analysis. There are diverged in their tissues and also in different animals inhabit in different place, but no electrophoretic difference observed between males and females for the analysis of LDH isozyme in the six tissues (heart, liver, lung, spleen, kidney and muscle). The results suggested that these tree shrews are three subspecies which confirm some reports on morphology tudy in tree shrews.

Key wrods: Tree shrews, Lactate dehydrogenase (LDH), Isozyme